

8. Instruktsiia po veterinarnomu primeneniiu lek-arstvennogo preparata Vakkmast / Organizatsiia-razrabotchik: NPP «Agrofarm». Nomer registratsionnogo

udostovereniia 15-3-7.14-3350 No. PVR-3-6.9/02448 ot 01.08.16.



УДК 636.2.57.045

DOI: 10.53083/1996-4277-2023-228-10-60-65

С.М. Борунова, Б.С. Иолчиев,
П.Н. Абрамов, Н.В. Попова
S.M. Borunova, B.S. Iolchiev,
P.N. Abramov, N.V. Popova

КРАТКОСРОЧНОЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЕ ХРАНЕНИЕ СЕМЕНИ БАРАНОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ

SHORT-TERM HYPOTHERMIC STORAGE OF STUD RAM SEMEN

Ключевые слова: разбавители, бараны-производители, спермы, активность сперматозоидов, краткосрочное хранение, хроматин, акросомы, цитоплазматическая мембрана, выживаемость сперматозоидов, оценка качества спермы.

Качество спермы является одним из основных факторов эффективности использования технологии искусственного осеменения в животноводстве. С учетом биологической особенности овец и специфики отрасли для искусственного осеменения в овцеводстве используются нативным, охлажденным и заморожено-оттаянным семенем. При краткосрочном хранении и криоконсервации состав разбавителей имеет решающее значение. Цель исследования заключалась в разработке среды при гипотермическом краткосрочном хранении спермы баранов-производителей. Для исключения влияния индивидуальных особенностей баранов-производителей (n-7) образцы спермы смешивали и разделяли на 2 равные аликвоты и разбавляли разбавителями до концентрации 100×106 /мл. В течение эксперимента получили 72 эякулята. В качестве контрольного разбавителя использовали желточно-триглюкозный разбавитель, экспериментальный разбавитель с базовым составом (трис-цитратный буфер, лимонная кислота, фруктоза, полиген с добавлением яичного желтка, витаминов С, Е и триглицериды 5мМ). Оценку качества спермы проводили с использованием CASA (computer-assisted semen analysis) технологии на оборудовании и программном обеспечении «Minitube». Изучали степень фрагментации ядерной ДНК (ядДНК), целостность плазматических мембран сперматозоидов. Анализ показателей, характеризующих биологическую полноценность спермы, в образцах проводили через 0, 24, 72, 144, 216 ч хранения. В экспериментальной среде подвижность сперматозоидов через 9 сут. составляет $44,72 \pm 3,62\%$, в контрольной среде – $30,92 \pm 2,64\%$, целостность плазматической мембраны – $46,83 \pm 0,74$ и $34,72 \pm 0,87\%$ соответственно. Индекс фрагментации яДНК в контрольной среде за период хранения увеличился в 8 раз, в экспериментальном разбавителе – в 5 раз. Таким образом, использование экспериментальной среды с базовым составом (трис-цитратный буфер, лимонная кислота, фруктоза и полиген с добавлением яичного желтка, витаминов С, Е и триглицериды

5мМ) для краткосрочного хранения семени баранов-производителей позволяет сохранять биологическую полноценность сперматозоидов до 9 сут.

Keywords: diluents, stud rams, sperm, sperm activity, short-term storage, chromatin, acrosomes, cytoplasmic membrane, sperm survival, sperm quality evaluation.

Sperm quality is one of the main factors of the effectiveness of using artificial insemination technology in animal husbandry. Considering sheep biological characteristics and the specifics of the sheep breeding industry, native, chilled and frozen-thawed semen is used for artificial insemination. For short-term storage and cryopreservation, the composition of diluents is critical. The research goal was to develop the environment for hypothermic short-term storage of stud ram semen. To eliminate the influence of the individual characteristics of stud rams (n = 7), semen samples were mixed and divided into two equal aliquots, and diluted to a concentration of 100×106 /mL. During the experiment, 72 ejaculates were obtained. As the control diluent, *Tris-Glucose-Yolk* diluent was used; the experimental diluent contained tris-citrate buffer, citric acid, fructose, polygen with the addition of egg yolk, vitamins C, E, and triglyceride 5 mM. Sperm quality was evaluated by using CASA (computer-assisted semen analysis) technology on Minitube equipment and software. We studied the degree of nuclear DNA fragmentation (nDNA), the integrity of the plasma membranes of spermatozoa. The analysis of the indices characterizing the biological value of sperm in the samples was carried out in 0, 24, 72, 144, 216 hours of storage. In the experimental environment, the sperm motility in 9 days was $44.72 \pm 3.62\%$; in the control environment - $30.92 \pm 2.64\%$; the integrity of the plasma membrane was 46.83 ± 0.74 and $34.72 \pm 0.87\%$, respectively. The fragmentation index of nDNA in the control medium increased eight times during the storage period, and five times in the experimental diluent. Thus, the use of the experimental medium with a basic composition of tris-citrate buffer, citric acid, fructose and polygen with the addition of egg yolk, vitamins C, E and triglyceride 5 mM for short-term storage of stud ram semen allows maintaining the biological full value of spermatozoa for up to 9 days.

Борунова Сеидфатима Мировна, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва, Российская Федерация, e-mail: fatima.borunova@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3445-3513; SPIN-код: 8181-5795; AuthorID: 830710.

Иолчиев Байлар Садрадинович, д.б.н., вед. науч. сотр., Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Московская обл., Российская Федерация, e-mail: baylar1@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-5386-7263; SPIN-код: 3881-6813; AuthorID: 123220.

Абрамов Павел Николаевич, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», г. Москва, Российская Федерация, e-mail: abramov_p@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-6137-0414; SPIN-код: 3170-6742; AuthorID: 829056.

Попова Надежда Владимировна, директор, ООО «Восход», Тарусский район, Калужская обл., Российская Федерация, e-mail: n.popova@dorper-voshod.ru.

Borunova Seidfatima Mirovna, Dr. Bio. Sci., Prof., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation, e-mail: fatima.borunova@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3445-3513; SPIN: 8181-5795; AuthorID: 830710.

Iolchiev Baylar Sadraddinovich, Dr. Bio. Sci., Leading Researcher, Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow Region, Russian Federation, e-mail: baylar1@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-5386-7263; SPIN: 3881-6813; AuthorID: 123220.

Abramov Pavel Nikolaevich, Dr. Bio. Sci., Prof., Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Skryabin, Moscow, Russian Federation, e-mail: abramov_p@inbox.ru; ORCID: 0000-0002-6137-0414; SPIN: 3170-6742; AuthorID: 829056.

Popova Nadezhda Vladimirovna, Director, ООО “Voskhod”, Tarusa District, Kaluga Region, Russian Federation, e-mail: n.popova@dorper-voshod.ru.

Введение

Искусственное осеменение является одними из эффективных методов интенсификации воспроизводства в овцеводстве [1-3]. Оно актуально для всех типов хозяйств независимо от формы собственности, особенно важно для крупных хозяйств, в том числе и комплексов. Качество спермы при искусственном осеменении является одним из ключевых факторов результативности осеменения. Длительное хранение половых клеток как в медицине, так и в животноводстве считается важнейшим аспектом репродуктивной технологии [4]. В овцеводстве используется искусственное осеменение нативным, охлажденным и заморожено-оттаянным семенем баранов-производителей. Каждый из этих методов имеет определенные преимущества и недостатки, нативная сперма при комнатной температуре за короткий срок теряет подвижность и становится непригодной для использования. Ее невозможно транспортировать на большое расстояние без соответствующей технологической обработки [5]. Криоконсервация позволяет длительно хранить и транспортировать сперму на большое расстояние [6, 7]. Однако есть большой недостаток данного метода: в результате замораживания-оттаивания спермы значительная часть сперматозоидов погибают и их оплодотворяющая способность снижается [8-10]. В овцеводстве используется осеменение охлажденной разбавленной спермой. Сперма баранов отличается от других видов животных высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), что делает их очень восприимчивыми к содержанию АФК [11-13]. Сперма восприимчива к экзогенным факторам, таким как температура, pH, осмотическое давление, к эндогенным факторам – продукты их собственного метаболизма. Одним из продуктов метаболизма является активная форма кислорода. Избыток АФК взаимо-

действует с ПНЖК плазматической мембраны сперматозоидов, вызывая перекисное окисление липидов и, в конечном итоге, разрушая структуру мембраны и снижая функцию плазмы сперматозоидов. Кроме того, окисление липидов приводит к образованию липидных альдегидов, повреждают ДНК в ядре сперматозоидов, что приводит к их гибели [14, 15]. Сперматозоиды испытывают дефицит эндогенных антиоксидантов, что вызывает нарушение целостности их плазматической мембраны [16]. Разработка сред и способов хранения охлажденной спермы баранов-производителей является актуальной темой отрасли.

Целью исследований являлась разработка сред для разбавления и сохранения охлажденной спермы баранов-производителей.

Для достижения цели поставлена **задача** изучения влияния состава среды и продолжительности хранения охлажденной спермы на параметры, характеризующие биологическую полноценность сперматозоидов.

Объекты и методы исследований

Исследования проводились в кафедре диагностики болезней, терапии, акушерства и репродукции животных Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина и ООО «Восход». Объектом исследований являлись бараны-производители породы дорпер (n=7). Материал исследования – сперма баранов-производителей. Условия содержания и уровень кормления баранов были одинаковыми и соответствовали технологии содержания и уровню кормления баранов-производителей. Сбор эякулята (n=72) проводили в искусственную вагину. Эякуляты передавались в лабораторию для оценки качества спермы. Образцы, которые не соответствовали тре-

бованиям ГОСТ 32200-2013, выбраковывали. Для исключения влияния индивидуальной особенности баранов-производителей образцы спермы смешивали. Образцы разделили на две равные аликвоты и разбавили разбавителями до концентрации 100×10^6 /мл. Разбавленные образцы в течение 90 мин. охладили до 2°C в водяной бане. В качестве контрольного разбавителя использовали желточно-трис-глюкозный разбавитель: глюкоза (0,8 г), цитрат натрия (2,8 г), трис (3,07 г), БСА (300 мг), витамин С (300 мг), стрептомицин (100 000 МЕ), растворенные в 100 мл в бидистиллированной воде. Перед использованием на 85 мл раствора добавили 15 мл яичного желтка, смесь перемешивали до полного растворения. Базовый состав экспериментальной среды следующий: трис-цитратный буфер (2,74 г), лимонная кислота (1,52 г), фруктоза (2,0 г) и 0,03 г полиген, растворенные в 100 мл бидистиллированной воде. Перед использованием к 85 мл базовой среды добавляли 15 мл яичного желтка, витамин С (300 мг), триголоза 5мМ, витаминЕ (80μМ). Оценку качества спермы проводили с использованием CASA (computer-assisted semen analysis) технологии на оборудовании с программным обеспечением «Minitube». Состояние акросом сперматозоидов определяли с использованием дифференциального окрашивания Дифф-Квик (Диахим, Россия). Для оценки степени фрагментации ядерной ДНК (ядНК) использовали акридин-оранжевый тест (АО-тест) с последующей флуоресцентной микроскопией *NikonEclipseNi* («Nikon Corporation», Япония). Целостность плазматических мембран сперматозоидов оценивали с помощью теста на гипотоническое набухание. Анализ показателей, характеризующих биологическую полноценность спермы, в образцах проводили через 0, 24, 72, 144, 216 ч хранения; статистический анализ полученных материалов – с использованием программного обеспечения IBMSPSS v.23. Осуществляли дисперсионный анализ. Для определения разницы средних величин между средними показателями использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

После разбавления семени между образцами в зависимости от состава среды достоверная разница по параметрам, косвенно характеризующих биологическую полноценность спермы, не установлена. Содержание сперматозоидов с прогрессивным движением после разбавления в образцах, разбавленных желточно-трис-глюкозным разбавителем, составило $90,31 \pm 2,62\%$. В образцах, где был использован экспериментальный разбавитель, данный показатель в среднем составил $91,81 \pm 1,95\%$, разница между показателями не имеет достоверное значение (табл. 1). Тенденция преимущества содержания сперматозоидов с прогрессивным движением в об-

разцах, разбавленных опытной средой, сохраняется. Содержание сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением при хранении в холодильной камере ($t=0 +5^\circ\text{C}$) через 144 ч в контрольной среде снизилась с 90,31 до 38,92%, в опытной среде – с 91,81 до 44,72%. В период краткосрочного хранения активность сперматозоидов в контрольной среде уменьшилась в 2,3 раза, в опытной среде в 2,05. Разница между образцами через 72-часовое хранение по содержанию сперматозоидов с прогрессивным движением в зависимости от состава среды становилась достоверной. В контрольных образцах содержание сперматозоидов с прогрессивным движением через 216 ч составило 30,92%, в опытных образцах – 44,72%. Исследования, проведенные отечественными и зарубежными учеными в области медицины, показывают, что в зависимости от состава разбавителя активность сперматозоидов при гипотермическом хранении в течение 14 дней снизилась до 18,1% [18, 19].

Таблица 1
Влияние состава среды на подвижность, характер движения и сперматозоидов

Показатели	Время, ч	Среда	
		контрольная	опытная
PR, %	0	90,31±2,62	91,81±1,95
	24	82,61±3,51	84,32±2,84
	72	72,45±2,83	76,35±2,41
	144	42,74±3,55	58,36±1,93*
	216	30,92±2,644	44,72±3,62*
VSL, мкм/сек.	0	47,74±2,26	49,56±1,43
	24	39,67±1,94	43,62±2,51
	72	28,54±1,37	31,40±1,26
	144	24,86±0,47	27,14±0,71*
	216	22,45±0,84	25,32±0,63*
VCL мкм/сек.	0	82,12±1,43	83,36±1,61
	24	68,41±0,96	79,27±1,83
	72	62,37±0,84	65,41±0,92
	144	58,46±0,97	61,27±1,52
	216	53,15±0,62	57,73±1,31
VAP мкм/сек.	0	60,24±1,86	62,32±1,75
	24	52,34±1,12	55,21±1,46*
	72	44,85±1,53	47,26±1,85
	144	36,25±1,78	39,65±1,98
	216	22,32±2,83	26,46±1,97

Примечание. PR – прогрессивно-подвижные сперматозоиды; VSL – прямолинейная скорость сперматозоидов; VCL – криволинейная скорость сперматозоидов; VAP – средняя скорость по траектории.

До 72 ч хранения между образцами по показателям, характеризующим прямолинейную скорость сперматозоидов, достоверная разница не установлена, на 6-е и 9-е сут. хранения разница между средними показателями по данному параметру имеет достоверное значение. Прямолинейная скорость сперматозоидов в опытных средах превосходит данный показатель сперматозоидов в образцах, разбав-

ленных контрольной средой, на 2,67 и 2,73 мкм/сек. ($p < 0,05$). Средняя криволинейная скорость в зависимости от используемой среды имела достоверную разницу, через 24 ч хранения данный показатель в образцах, разбавленных опытной средой, на 5,25 мкм/сек. ($p < 0,05$) был выше, чем в контрольной среде. Средняя скорость по траектории сперматозоидов в опытной среде во все периоды хранения имела преимущество, разницы по данному параметру не имели достоверного значения, при этом тенденция сохранялась во все периоды хранения. После разбавления целостность акросом в образцах составила более 94% (табл. 2). В первые сутки хранения по целостности акросом сперматозоидов между образцами достоверная разница не установлена. Через 72 ч хранения содержание сперматозоидов с интактными акросомами в образцах, разбавленных контрольной средой, в среднем составило 73,64%, в экспериментальной среде – 79,32%, разница между средними показателями является статистически значимой. Целостность акросом в контрольной среде через 216 ч хранения снизилась на 46, 25 пункта и составила 48,47%, в экспериментальной среде – 30,83%. Разница между контрольной и экспериментальной средой по содержанию интактных акросом на 216-м ч хранения составляет 15,38% ($p < 0,01$). В зависимости от состава разбавителя статистически значимая разница между средними показателями по целостности плазматической мембраны установлена через 72 ч хранения, в образцах, разбавленной контрольной средой, данный показатель составил 58,31%, что на 8,21% меньше, чем в образцах с опытной средой ($p < 0,05$). Разница между средними показателями к 216 ч хранения увеличилась до 12,11% ($p < 0,001$). Результаты исследования других авторов также свидетельствуют о том, что с увеличением продолжительности гипотремического хранения значительно снижалась целостность плазматической мембраны сперматозоидов.

Таблица 2
Сохранность акросом и целостности плазматической мембраны сперматозоидов при краткосрочном хранении в зависимости от состава среды

Показатели	Время, ч	Среда	
		контрольная	опытная
Целостность акросом, %	0	94,72±1,84	94,68±1,67
	24	81,48±2,26	82,64±1,97
	72	73,64±1,49	79,32±1,17*
	144	57,75±1,34	71,12±1,52**
	216	48,47±1,89	63,85±2,23**
Целостность плазматической мембраны, %	0	79,91±1,42	79,63±1,18
	24	74,56±1,83	76,57±1,66
	72	58,31±1,75	66,52±1,47*
	144	48,74±0,62	54,61±0,85**
	216	34,72±0,87	46,83±0,74***

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Индекс фрагментации ядерной ДНК в исследуемых образцах до 72 ч хранения в образцах, разбавленных контрольной средой, составил 9,18±0,18%, в экспериментальной среде – 7,32±0, разница не является статистически значимой (рис.). Увеличение продолжительности хранения разбавленного семени сопровождается увеличением частоты встречаемости сперматозоидов с различной степенью фрагментации, и разница средних показателей в зависимости от используемой среды разбавления. Через 144 ч содержание сперматозоидов с фрагментированной яДНК в контрольных образцах в среднем составило 16,82±1,31%, в опытных – 10,53±1,24% ($p < 0,05$).

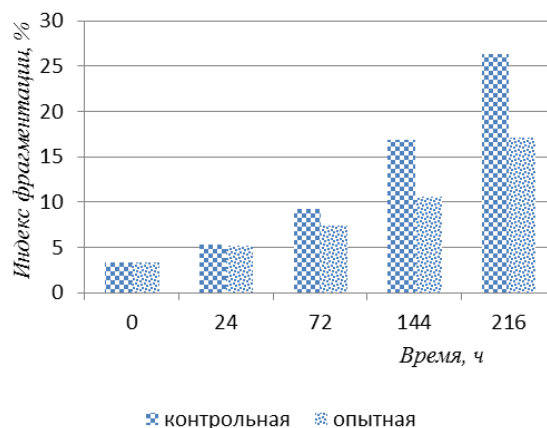


Рис. Индекс фрагментации яДНК в сперматозоидах

Фрагментация яДНК прогрессировала в контрольных образцах и к 216 ч составила 26,31±1,47%, в опытных образцах этот процесс происходил медленно и составил 17,11±1,53%. Мониторинг динамики индекса фрагментации яДНК показывает, что при краткосрочном хранении сперматозоидов данный показатель прогрессирует [20, 21].

Заключение

Использование экспериментальной среды с базовым составом (трис-цитратной буфер, лимонная кислота, фруктоза и полиген с добавлением яичного желтка, витаминов С, Е и триголозы 5мМ) для краткосрочного хранения семени баранов-производителей позволяет сохранять биологическую полноценность сперматозоидов до 9 сут.

Библиографический список

1. Современные методы искусственного осеменения в овцеводстве / Г. П. Дюльгер, В. В. Храмов, П. Г. Дюльгер, Е. С. Седлецкая. – Текст: непосредственный // Овцы, козы, шерстяное дело. – 2017. – № 1. – С. 18-21.
2. Магомедов, З. З. К вопросу об искусственном осеменении овец в Дагестане / З. З. Магомедов, Р. А. Велибеков. – Текст: непосредственный // Сельскохозяйственный журнал. – 2009. – № 1-1.

3. Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16 (4), 803–809. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>.
4. Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78 (8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>.
5. Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marín, C. C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.008>.
6. К вопросу о сохранении генофонда и биологической полноценности криоконсервированной спермы / А. М. М. Айбазов, П. В. Аксенова, К. К. Ашурбегов, Д. В. Коваленко. – Текст: непосредственный // Сельскохозяйственный журнал. – 2011. – № 4-1. – С. 24-29.
7. Багиров, В. А. Характеристика качественных показателей семени гибридных овец с различной кровностью по архару / В. А. Багиров, Б. С. Иолчиев, Н. А. Зиновьева. – Текст: непосредственный // Достижения науки и техники АПК. – 2017. – № 5. – С. 43-45.
8. Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>.
9. Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48 (2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>.
10. Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10 (1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>.
11. Wang, Y., Zhang, L., Sohail, T., Kang, Y., Sun, X., & Li, Y. (2022). Chlorogenic Acid Improves Quality of Chilled Ram Sperm by Mitigating Oxidative Stress. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 12 (2), 163. <https://doi.org/10.3390/ani12020163>.
12. Eslami, M., Ghasemiyan, H., & Zadeh Hashem, E. (2017). Semen supplementation with palmitoleic acid promotes kinematics, microscopic and antioxidative parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 52 (1), 49–59. <https://doi.org/10.1111/rda.12802>.
13. Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21 (1), 1–7.
14. Aitken R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84 (10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>.
15. Teodoro, J. S., Palmeira, C. M., & Rolo, A. P. (2018). Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1782, 109–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_6.
16. Liu, G., Pan, B., Li, S., Ren, J., Wang, B., Wang, C., Su, X., & Dai, Y. (2020). Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 97, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.007>.
17. Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 (7), 1562–1567. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562>.
18. Хранение спермы человека в течение 2 недель без замораживания / Д. А. Исаев, В. В. Заева, Р. В. Бакурадзе [и др.]. – Текст: непосредственный // Проблемы репродукции. – 2009. – № 5. – С. 33-35.
19. Saito, K., Kinoshita, Y., Kanno, H., Iwasaki, A., & Hosaka, M. (1996). A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 degrees C. *Fertility and Sterility*, 65 (6), 1210–1213. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58340-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58340-x).
20. Краткосрочное хранение спермы без замораживания в программах ЭКО/ИКСИ / Д.А. Исаев, Е.Е. Захарова, И.В. Капралова [и др.]. – Текст: непосредственный // Проблемы репродукции. – 2015. – № 21 (4). – С. 65-70.
21. Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., et al. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84 (4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>.

References

1. Diulger G.P., Khramtsov V.V., Diulger P.G., Sedletskaia E.S. *Sovremennye metody iskusstvennogo osemneniia v ovtsevodstve // Ovttsy, kozy, sherstianoe delo.* – 2017. – No. 1. – S. 18-21.

2. Magomedov Z. Z., Velibekov R. A. K voprosu ob iskusstvennom osemenenii ovets v Dagestane // Selskokhoziaistvennyi zhurnal. – 2009. – No. 1-1.
3. Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16 (4), 803–809. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>.
4. Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78 (8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>.
5. Arando, A., Gonzalez, A., Delgado, J. V., Arrebola, F. A., & Perez-Marin, C. C. (2017). Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 181, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.008>.
6. Aibazov A.M.M., Aksenova P. V., Ashurbegov K. K., Kovalenko D. V. K voprosu o sokhranении genofonda i biologicheskoi polnotsennosti kriokonservirovannoi spermy // Selskokhoziaistvennyi zhurnal. – 2011. – No. 4-1. – S. 24-29.
7. Bagirov V.A., Iolchiev B.S., Zinoveva N.A. Kharakteristika kachestvennykh pokazatelei semeni gibridnykh ovets s razlichnoi krovnostiu po arkharu // Dostizheniia nauki i tekhniki APK. – 2017. – No. 5. – S. 43-45.
8. Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>.
9. Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48 (2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>.
10. Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10 (1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>.
11. Wang, Y., Zhang, L., Sohail, T., Kang, Y., Sun, X., & Li, Y. (2022). Chlorogenic Acid Improves Quality of Chilled Ram Sperm by Mitigating Oxidative Stress. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 12 (2), 163. <https://doi.org/10.3390/ani12020163>.
12. Eslami, M., Ghasemiyan, H., & Zadeh Hashem, E. (2017). Semen supplementation with palmitoleic acid promotes kinematics, microscopic and antioxidative parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 52 (1), 49–59. <https://doi.org/10.1111/rda.12802>.
13. Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21 (1), 1–7.
14. Aitken R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*, 84 (10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>.
15. Teodoro, J. S., Palmeira, C. M., & Rolo, A. P. (2018). Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1782, 109–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_6.
16. Liu, G., Pan, B., Li, S., Ren, J., Wang, B., Wang, C., Su, X., & Dai, Y. (2020). Effect of bioactive peptide on ram semen cryopreservation. *Cryobiology*, 97, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.007>.
17. Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., et al. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 15 (7), 1562–1567. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562>.
18. Isaev D.A., Zaeva V.V., Bakuradze R.V., Krivokharchenko I.S., Zaletov S.Iu. Khranenie spermy cheloveka v techenie 2 nedel bez zamorazhivaniia // Problemy reproduksii. – 2009. – No. 5. – S. 33-35.
19. Saito, K., Kinoshita, Y., Kanno, H., Iwasaki, A., & Hosaka, M. (1996). A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 degrees C. *Fertility and Sterility*, 65 (6), 1210–1213. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58340-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58340-x).
20. Isaev D.A., Zakharova E.E., Kapralova I.V., Krivokharchenko I.S., Kartavenko T.V., Mikhailovskaia G.V., Zharskaia O.O., Zaletova V.V. Kratkosrochnoe khranenie spermy bez zamorazhivaniia v programmakh EKO/IKSI // Problemy reproduksii. – 2015. – No. 21 (4). – S. 65-70.
21. Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., et al. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, 84 (4), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>.

Выполнено в рамках научно-исследовательских работ по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за счет средств федерального бюджета. Соглашение от 30.01.2023 № 082-03-2023-238.

